



PCT/FR 03 / 03675

REC'D 23 FEB 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le _____

19 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire 08 540 B W / 210502

DB 540 8 H / 210502

REMISETTE DEPIE DATE 12 DEC 2002 LIEU 69 INPI LYON		Réservé à l'INPI	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		0215718 12 DEC. 2002	
Vos références pour ce dossier <i>(facultatif)</i> U19-B-19536 FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 MATURE DE LA DEMANDE		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCEDE DE CRIBLAGE DESDITES MOLECULES INHIBITRICES			
4 DECLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> N°	
<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE JOSEPH FOURIER	
Prénoms			
Forme juridique		Université Publique à Caractère Scientifique et Culturel	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège		Rue <input type="text"/> 621 Avenue Centrale	
		Code postal et ville <input type="text"/> GRENOBLE Cédex 9	
		Pays <input type="text"/> FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprime « Suite »

Remplir impérativement la 2^{me} page

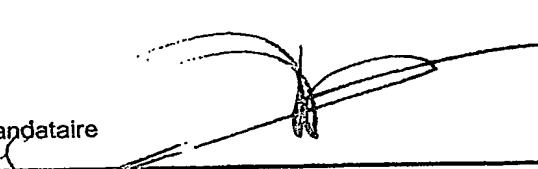
BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE 12 DEC 2002		Réserve à l'INPI
DATE	69 INPI LYON	
LEU	0215718	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 V / 210502

6 MANDATAIRE (n'y a lieu)		VUILLEMOZ
Nom		Bruno
Prénom		CABINET LAURENT & CHARRAS
Cabinet ou Société		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-2047
Adresse	Rue	20 Rue Louis Chirpaz B.P. 32
	Code postal et ville	16 91311 EULLY Cédex
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Etablissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques
		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		 Bruno VUILLEMOZ, Mandataire

VISA DE LA PRÉFECTURE

NOU DE L'INPI

IS

**MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHESE PROTEIQUE DU VIRUS DE
L'HEPATITE C ET PROCEDE DE CRIBLAGE DESDITES MOLECULES
INHIBITRICES**

5

L'invention se rapporte au traitement de pathologies virales ou non virales dans lesquelles sont impliquées des protéines, dont la synthèse est initiée par le biais d'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), dont au moins une partie de la séquence est similaire d'un IRES à l'autre. Parmi ces pathologies figurent notamment mais de façon non limitative, 10 parmi les pathologies virales, les virus appartenant à la famille des Flaviridae tels que le virus de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV), et parmi les pathologies non virales, les cancers dans lesquels sont impliquées certaines protéines, telles que par exemple les facteurs de croissance fibroblastiques responsables de la néovascularisation des tumeurs en développement, le proto-oncogène c-myc etc.... 15 Plus précisément, le traitement proposé dans l'invention consiste à empêcher la fixation du facteur d'initiation de la traduction, eIF3, sur l'ARN constitutif de la partie 5'non codante de la séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) des génomes viraux ou de certains gènes impliqués dans les pathologies précitées, de sorte à inhiber la synthèse protéique. En conséquence, l'invention a également pour objet un procédé de criblage de 20 molécules aptes à inhiber la formation du complexe : séquence de l'IRES / eIF3, en particulier la sous-unité protéique p110 (également dénommée p116 (BLAST P55884)) de eIF3.

Le processus de recherche et développement de nouvelles molécules thérapeutiques 25 «Drug Discovery» nécessite avant tout l'identification de nouvelles cibles associées aux maladies (protéine, ARN ou ADN) et leurs validation. La cible identifiée et validée est ensuite utilisés dans des tests de criblage de molécules, qui permettent de sélectionner des molécules actives. C'est cette approche qui est proposée par le Demandeur, la cible étant constituée par une séquence spécifique d'IRES.

30

Dans la suite de la description, l'invention est plus particulièrement décrite en rapport avec le traitement du virus du VHC bien que celle-ci s'applique également au virus de la peste porcine (CSFV) ou celui de la diarrhée bovine (BVDV), et ce, compte tenu de la forte homologie existant entre ces virus appartenant à la même famille.

Le virus de l'hépatite C a été identifié comme étant responsable de l'hépatite non A non B développée fréquemment au cours de pathologies chroniques malignes, du type par exemple cirrhose du foie ou encore carcinome hépato-cellulaire. Le VHC est transmis par transfusion sanguine ou de dérivés sanguins. Le génome du VHC se présente sous forme d'ARN simple brin d'une taille avoisinant les 9,4 kB et codant pour une polyprotéine unique constituée de 3 010 acides aminés (CHOI et al., 1989).

Contrairement au schéma classique, l'initiation de la traduction de l'ARN messager de VHC ne se fait pas par reconnaissance de la coiffe (ou CAP), puisque celle-ci est absente (traduction dite "cap-dépendante"), mais par le biais d'un site d'entrée interne des ribosomes (IRES), positionné au niveau de la région 5' non traduite (5'-UTR) du VHC, entre les nucléotides 40 et 372 de la séquence du VHC (traduction dite "cap-indépendante"). Le mécanisme de synthèse des protéines virales étant très différent de celui de la cellule-hôte, une stratégie possible de développement de nouvelles molécules thérapeutiques consiste à inhiber la synthèse protéique virale sans influence aucune sur la synthèse protéique de la cellule hôte. De plus, la séquence de l'IRES étant une région très conservée chez ce virus réputé très variable (92% d'homologie), on peut s'attendre à ce que l'utilisation de cette séquence comme cible, soit particulièrement intéressante.

Différentes études de structures ont montré que l'IRES du VHC était replié sur lui-même pour former trois domaines ou régions, en boucle, respectivement les régions II (IIa, IIb), III (IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf) et IV tels que représentées sur la figure 1 (ZHAO et al, 2001), l'IRES comprenant en outre un codon start AUG. L'ARN simple brin du CSFV et du BVDV contient également une séquence IRES contenant un codon start AUG, la structure de l'IRES étant similaire à celle du VHC (figure 1). En outre et comme le montre la figure 2, l'alignement des séquences constitutives du génome de ces trois virus montre une forte homologie de la région II de l'IRES, notamment du site de reconnaissance MRR, ce qui tend à laisser penser que les molécules agissant sur l'IRES du VHC pourraient également agir sur celui du CSFV ou du BVDV.

En pratique, l'initiation de la traduction de l'ARNm débute par la reconnaissance et la fixation par l'IRES de la sous-unité ribosomique 40S et de facteurs d'initiation, en particulier, le facteur d'initiation dénommé "eIF3".

Le facteur d'initiation eIF3 est un complexe multiprotéique constitué de 10 sous-unités différentes telles que par exemple p47, p66, p110/166 et p170. Les études de prédiction

de structures ont montré que la sous-unité p110 présentait dans sa partie centrale, située entre les acides aminés 185 et 279, un motif de reconnaissance de l'ARN (MRR). La localisation du motif de reconnaissance de la sous-unité p110 de eIF3 est représentée sur la figure 2. Ce type de motif est retrouvé dans un grand nombre de protéines se liant à l'ARN (RNA binding protein), telles que par exemples les protéines hnRNP ou encore snRNP, mais également dans quelques protéines se liant à de l'ADN simple brin. D'après les algorithmes de prédition de structure secondaire, la partie centrale de la sous-unité p110 est repliée selon une conformation similaire à celle des MRR connus pour les acides aminés conservés IVVD et TK/RGF/YVE localisés dans des feuilles 1 et 3 correspondants aux motifs de reconnaissance RNP-2 et RNP-1 (voir figure 2). Bien que de par sa structure secondaire et son homologie, le MRR de p116 de eIF3 réponde aux critères putatif RNA-binding protéines, sa réelle capacité à fixer l'ARN n'a jamais été mise en évidence auparavant.

En effet, le document FR-A-2 815 358 décrit une méthode de traitement de l'hépatite C consistant à empêcher la synthèse protéique du VHC par inhibition supposée de la fixation de la sous-unité p110 de eIF3 sur la région III de l'IRES. Les molécules candidates à cette inhibition correspondent à des polypeptides présentant une affinité avec la région III de l'IRES supérieure à celle de la sous-unité p110 de eIF3. En pratique, les inhibiteurs polypeptidiques sont obtenus par criblage de protéines p110 mutées avec la séquence IRES de VHC. Plus précisément, seule la partie centrale correspondant au motif de reconnaissance (MRR) est mutée, le polypeptidique étant susceptible de se fixer sur la boucle IIIb de l'IRES de VHC avec une affinité supérieure ou égale à celle du MRR non muté de p110. En pratique, les mutations sont introduites dans le MRR par mutagénèse aléatoire ou par mutagénèse ciblée selon la technique de phage display. Là encore, aucune indication n'est donnée concernant la séquence nucléotidique de la région III de l'IRES susceptible d'interagir avec le MRR muté. En outre, aucun résultat d'une éventuelle inhibition n'est donné dans les exemples.

Sizova et al, 1998, ont montré que eIF3 protégeait la région apicale IIIb de l'IRES du VHC et du CSFV, en particulier les Nt 204, 212, 214, 215 et 220 (voir figure 1 du document), du clivage enzymatique ou de modifications chimiques. Plus récemment, Kieft et al, 2001, en utilisant les mêmes méthodes que celles mises en œuvre par SIZOVA précité, ont identifié les nucléotides de la boucle IIIb comme étant les éléments principaux de l'interaction. De plus, en utilisant la technique dite «filter-binding assay»,

ces différents auteurs ont montré que la délétion de la région apicale IIIb entraînait une diminution de l'interaction eIF3-IRES d'au moins 10-fois. Ainsi, la boucle apicale IIIb est actuellement considérée comme étant le site le plus probable de fixation de eIF3. Toutefois, aucun de ces documents ne montre de manière précise l'existence d'une interaction entre le domaine IIIb isolé et eIF3. De même, aucun d'entre eux n'identifie une séquence d'ARN spécifique se liant à eIF3.

Buratti et al, 1998, a montré que les protéines p170 et 116/p110 de eIF3 se liaient à la région III de l'IRES de VHC sans toutefois, là encore, identifier la séquence d'ARN de l'IRES envisagée.

On sait que les ARN-binding protéines et leur MRR ne reconnaissent que des séquences courtes (<10 nt) à l'intérieur de ces ARN bien qu'elles soient impliquées dans le transport et la maturation d'ARN messagers comprenant 1000nt et plus. Or, parmi ces séquences courtes, il est important d'identifier la séquence minimale de l'ARN de l'IRES interagissant avec le MRR. En effet, l'identification de cette séquence minimum permet tout d'abord de comprendre le mécanisme de l'interaction, mais aussi de concevoir des oligonucléotides antisens complémentaires (de taille comprise généralement entre 30-35nt) susceptibles d'inhiber la formation du complexe ARN/protéine ou dans le cas d'ARNi (ARN d' interférence ou silencing de taille comprise entre 21-23 nt) de cibler la région d'interaction. L'identification de la séquence minimale est également essentielle pour effectuer les études structurales nécessaires pour le criblage *in silico* ainsi que pour l'optimisation de molécules actives. Selon une technique connue de l'homme du métier, on recherche la structure atomique du complexe ARN/protéine ou ARN seul en 3 dimensions par RMN. On sait que cette technique ne peut être utilisée que pour des fragments d'ARN seul ou complexé, de faible taille (inférieure à 25 Nt). Une seconde technique correspond à la cristallographie aux rayons X, technique qui peut être appliquée aux fragments d'ARN de plus grande taille limitée toutefois à 70nt. Au contraire, la cristallographie des protéines n'est pas limitée par la taille mais ne peut 30 cependant n'être appliquée que sur des protéines isolées et non sur des complexes multiprotéiques, tels que eIF3. Mais dans la mesure où le MRR de eIF3 a été préalablement identifié, cette seconde technique peut être également envisagée à la condition de travailler sur des ARN de taille la plus faible possible, inférieure à 70 Nt.

En d'autres termes, l'un des problèmes que se propose de résoudre l'invention est d'identifier précisément la plus petite séquence d'ARN de l'IRES se liant au MRR de p110, de sorte à pouvoir utiliser cette séquence dans des méthodes de criblage de molécules d'intérêt, notamment par RMN ou cristallographie.

5

Au cours de sa recherche, le Demandeur a non seulement découvert que la sous-unité p110 de eIF3 ne se fixait pas sur la région III mais sur la région II de l'IRES de VHC, mais également réussi à identifier précisément la séquence nucléotidique de l'IRES, dénommée par la suite séquence consensus, interagissant avec le MRR de p110.

10

Compte tenu de l'homologie existant entre la séquence IRES de VHC et celles du CSFV et du BVDV, la découverte de la séquence consensus permet d'envisager de traiter les différentes pathologies dans lesquels ces virus sont impliqués, en bloquant la synthèse protéique par inhibition de la fixation de la sous-unité protéique p110 de eIF3, en particulier de son MRR, sur la région II de l'IRES de VHC.

Les molécules candidates peuvent être des molécules existantes ou futures dont les propriétés inhibitrices sont testées par criblage.

20

En conséquence, l'invention concerne tout d'abord un procédé de criblage de molécules selon lequel, *in vitro* :

- a/ on incube ensemble la sous unité p110 (SEQ ID4) de la protéine eIF3, la séquence nucléotidique de la région II (SEQ ID2) de l'IRES de VHC ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC et la molécule à tester,
- b/ on détecte ensuite la formation éventuelle de complexe p110 / région II IRES, l'absence de complexe témoignant de la capacité inhibitrice de la molécule testée, à inhiber la formation desdits complexes,
- c/ on sélectionne les molécules inhibant la formation des complexes.

30

Par molécule, on désigne toute molécule chimique d'origine synthétique ou naturelle, connue ou future.

Comme déjà dit, la sous unité p110 de eIF3 contient un motif de reconnaissance de l'ARN

35

(MRR) situé dans la partie centrale, plus spécifiquement entre les acides aminés 175 et

279 de la séquence SEQ ID4. La séquence d'acides aminés du MRR de p110 correspond à la séquence SEQ ID5.

En d'autres termes et dans un mode de réalisation avantageux du procédé de criblage de l'invention, seule la séquence du motif de reconnaissance de la protéine p110 (SEQ ID5) est incubée.

Par ailleurs et comme il sera démontré dans les exemples, le Demandeur à identifié précisément la séquence de la région II de l'IRES du VHC se liant au motif de reconnaissance de la protéine p110. Cette séquence dénommée dans la suite de la description "séquence consensus" contient 36 nucléotides situés entre les nucléotides 56 et 92 de la séquence IRES du VHC. La séquence de 35 nucléotides correspond à la séquence SEQ ID3.

En conséquence et dans un mode de réalisation préféré, seule une partie de la région II est incubée et correspond à la séquence nucléotidique consensus SEQ ID3 ou une séquence comprenant au moins 8nt successifs de la séquence SEQ ID 3.

En pratique, l'incubation est effectuée dans une solution tampon à température ambiante. Avantageusement, des concentrations croissantes de molécules à tester sont incubées afin de détecter une efficacité éventuellement dose dépendante.

La seconde étape du procédé consiste à détecter la formation de complexe protéine / ARN. Toute méthode de détection connue de l'homme du métier peut être mise en œuvre. Avantageusement, la détection est effectuée par filtration du mélange au travers d'une membrane de nitrocellulose, puis par mesure de la radioactivité liée à la membrane correspondant à la quantité d'ARN fixée sur la membrane.

D'autres techniques peuvent être utilisées telles que SPA (Scintillation Proximity Assay), HTRF(Homogeneous Time-Resolved Fluorescence), LANCE (Lanthanide Chelation Excitation), FP(Fluorescence Polarization), FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy), FL (Fluorescence Lifetime Measurements).

Dans un mode de réalisation avantageux, le procédé de criblage de l'invention comprend deux étapes supplémentaires consistant à tester, ex vivo, l'influence de la molécule

sélectionnée sur la traduction cap-indépendante et la traduction cap-dépendante, et à ne retenir que les molécules inhibant la traduction cap-indépendante du VHC sans influencer la traduction cap-dépendante.

5 Cette étape peut être mise en œuvre par toute méthode connue de l'homme du métier, en particulier par la construction de vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID
10 3 ; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement. Des cellules sont ensuite transfectées par les vecteurs bicistroniques puis le taux de traduction par Dual Luciférase est mesuré. Les cellules susceptibles d'être transfectées sont choisies de manière classique par l'homme du métier, telles que par exemples les cellule HeLa ou encore Huh 7.

15 En conséquence, l'invention concerne également l'utilisation des molécules identifiées à l'issue du procédé de criblage précédemment décrit pour la préparation d'un médicament, destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

20 Plus largement, toute molécule apte à d'inhiber in vitro la fixation de la protéine p110, en particulier son motif de reconnaissance (MRR) sur la région II ou une séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), notamment une partie de la région II correspondant à la séquence SEQ ID3 ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, peut être utilisée pour la fabrication d'un
25 médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

Dans le cadre d'un premier essai mettant en œuvre le procédé de criblage de l'invention, le
30 Demandeur a constaté que les aminoglycosides, en particulier la tobramycine, étaient aptes à inhiber la fixation du MRR de p110 sur la séquence consensus de la région II de l'IRES et qu'en outre, cette inhibition n'affectait pas la traduction cap-dépendante.

En conséquence, l'invention concerne également l'utilisation d'aminoglycosides, en particulier de la tobramycine, pour la fabrication d'une composition destinée au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

5 Par ailleurs, la découverte de la séquence consensus rend possible l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3 comme médicament, en particulier pour le traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV). Dans le même sens, des ARNi contenant 19
10 nucléotides de la séquence SEQ ID 3 (séquence consensus) flanqués par UU peuvent être utilisés comme médicament pour le traitement des mêmes pathologies que ci-dessus.

Dans un premier mode de réalisation, l'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.
15

Comme déjà dit, les molécules testées dans le procédé de criblage peuvent être des molécules connues telles que par exemple les aminoglycosides mais également des molécules restant à développer.
20

Dans ce dernier cas, il apparaît possible, d'identifier *in silico*, à partir d'une bibliothèque de molécules, des molécules capables d'inhiber la synthèse protéique des virus appartenant à la famille de Flaviridae.
25

En conséquence, l'invention concerne également un procédé de criblage d'une bibliothèque de molécules *in silico* consistant :

- à déterminer les coordonnées atomiques soit de la région II de l'IRES (SEQ ID 2) du VHC ou de toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC, soit de la séquence se liant spécifiquement au MRR de la protéine P110 de eIF3 (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, soit du complexe de la région II (SEQ ID 2) ou de la séquence spécifique (SEQ ID 3) avec le motif de reconnaissance de la protéine p110 de eIF3 (SEQ ID 35 5)

- puis à cribler la bibliothèque de molécules chimiques avec les coordonnées atomiques ainsi déterminées.

Toute logiciel connu de l'homme du métier pourra être utilisé pour la détermination des
5 coordonnées atomiques.

Les molécules ainsi identifiées pourront alors être testées dans le procédé décrit précédemment consistant à détecter *in vitro* des complexes ARN/protéine.

10 L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux de l'exemple de réalisation suivant à l'appui des figures annexées.

La figure 1A est une représentation de la structure de l'IRES de VHC. Celui-ci est constitué de 3 domaines en boucle, II (IIa, IIb), III (IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe, IIIf) et IV.

15 La figure 1B correspond à un alignement de séquences d'une partie de l'IRES de VHC, du BVDV et du CSFV (Nt 1 à 120). Comme le montre cette figure, il existe une forte homologie entre ces trois virus, notamment entre les nucléotides 80 et 110 situés dans la région II.

La figure 2 montre la localisation du Motif de Reconnaissance de l'ARN dans la
20 sous-unité p110 de eIF3 et la prédition de sa structure secondaire.

La Figure 3 compare la capacité du MRR de p110 à se fixer sur les régions II, IIIabc, IIIeffV et la totalité de l'IRES de VHC.

La figure 4 est un schéma montrant le principe du procédé de production de sous-fragments aléatoires de l'IRES de VHC.

25 La figure 5 est un schéma montrant le principe du procédé de sélection des sous-fragments aléatoires spécifiques du MRR de p110 de eIF3 obtenus selon le schéma de la figure 4, (5A) et les séquences des matrices de transcription et des amorces utilisées (5B).

La Figure 6 représente les résultats d'alignement de séquences d'ARN (orientation
30 antisens) sélectionnés à la fin des 4ème et 5ème cycle de selection/amplification (6A) et la localisation de la séquence «consensus» (orientation sens) dans l'IRES du VHC (6B).

La figure 7 montre la capacité de la séquence consensus à inhiber l'interaction entre IRES et MRR de p110.

La figure 8 représente l'effet des aminoglycosides sur la traduction cap-dépendante ex
35 vivo.

La figure 9 représente la capacité des aminoglycosides à inhiber la fixation du MRR d'elf3 sur la séquence consensus de la région II de l'IRES de VHC.

Exemple 1 : Mise en évidence de la capacité du motif de reconnaissance (MRR) de p110 à se fixer sur la région II de l'IRES de VHC

1/ Clonage et expression du motif de reconnaissance de p110 de eIF3

La séquence d'acides aminés du motif de reconnaissance (MRR) de la protéine p110 correspond à la séquence SEQ ID5 située entre les acides aminés 175 et 279 de la séquence SEQ ID4 (correspondant à la séquence de la protéine p110). L'ADNc codant pour le MRR est amplifié par RT-PCR à partir d'ADN extrait de cellules HeLa en présence des amorces suivantes :

- SEQ ID6 : CATATGGATCGGCCAGGAAGCAGATGGAATC
- SEQ ID7 : GTGCTCGAGCCACTCGTCACTGATCGTCATATA

Le fragment amplifié est cloné dans un plasmide pET-30b (Novagen) en fusion avec His₆-Tag C-terminal entre les sites *Nde* et *Xho*. La protéine est ensuite produite dans E. Coli (souche BL21lysS) puis purifiée sur Ni²⁺ - NTA agarose dans des conditions natives.

20

2/ Synthèse de l'IRES total et ses fragments IIIabc, IIIefIV et IIab

a/ Principe

On synthétise et on clone 4 séquences nucléotidiques différentes, respectivement :

- une séquence nucléotidique correspondant à la totalité de l'IRES située entre les nucléotides 40 et 372 de l'ADN de VHC (b),
- une séquence nucléotidique correspondant à la région IIIabc, située entre les nucléotides 141 et 252 de l'ADN de VHC (c),
- une séquence nucléotidique correspondant à la région IIIefIV située entre les nucléotides 250 et 372 de l'ADN de VHC (d),
- une séquence nucléotidique correspondant à la région IIab située entre les nucléotides 40 et 119 de l'ADN de VHC (e).

b/ Clonage de la totalité de la séquence nucléotidique de l'IRES (SEQ ID1)

L'ADNc de l'IRES (SEQ ID1) est amplifié par RT-PCR à partir d'ARN total isolé de patients atteints du VHC (génotype 1b) en présence des amorces nucléotidiques suivantes :

5 SEQ ID8 : ACCGCTAGCCTCCCTGTGAGGAACCTACT
 SEQ ID9GAAAGCTTTTCTTGAGGTTAGGATTGTGCTCATGATGC
 ACG

Le fragment amplifié est d'abord cloné dans un plasmide pGEM-T puis ensuite dans pSP-luc+ (Promega) entre des sites *NheI* et *Hind III*. Le plasmide pSP-IRES-luc+ ainsi 10 obtenu contient l'IRES du VHC cloné en fusion avec la luciférase sous contrôle du promoteur SP6.

Une fois séquencée (GenomeExpress, Grenoble), la séquence de l'IRES a été alignée et comparée aux autres séquences d'IRES déposées dans les banques (telles que D49374 ou 15 AF139594). L'identité observée était de 96,6% ce qui correspond au taux moyen de variabilité génomique des IRES entre différentes souches du VHC.

c/ Synthèse de la région IIIabc

La synthèse de l'ADNc de la région IIIabc est effectuée de la manière suivante. Deux 20 oligonucléotides chevauchant, dont le premier, SEQ ID10, est constitué du promoteur de la T7 polymérase et de la séquence nucléotidique de la région IIIa et IIIb (Nt 139-215 de l'ARN de VHC) et le second, SEQ ID11, de la séquence nucléotidique de la région IIIb et IIIc (Nt 193-252 de l'ARN de VHC) sont hybridés en présence d'un fragment de Klenow. Les oligonucléotides ont les séquences suivantes :

25 - SEQ ID10 : TAATACGACTCACTATAAGGGTAGTGGTCTGCGGAACCGGT
 GAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACC GGTCCTTCTGGATAAACCCGCT
 CAA
 - SEQ ID11 : TAGCAGTCTCGCGGGGGCACGCCAAATCTCCAGGCATTG
 AGCGGGTTGATCCAAGAAAG

30 Le fragment d'ADNc double brins obtenu est ensuite amplifié par PCR en présence de T7 correspondant à la SEQ ID 12 : TAATACGACTCACTATAAGGG. et d'un oligonucléotide flanquant dont la séquence est la suivante :

- SEQ ID13 : TAGCAGTCTCGCGGGGGCACG

d/ Synthèse de la région IIIefIV

L'ADNc correspondant à la région IIIefIV (Nt 250-372) a été obtenu par amplification PCR du plasmide pSP-ΔIRES-luc+ à l'aide des amorces dont les séquences nucléotidiques correspondent à celles de SP6 (SEQ ID14 : 5 TATTAGGTGACACTATAGAAT) et SEQ ID13. Le plasmide pSP-ΔIRES-luc+ résulte de la digestion du plasmide pSP-IRES-luc+ par NheI, les sites de coupure étant situés entre les nucléotides 39/40 et 248/249 de l'IRES. Le produit d'amplification SP6 -> SEQ ID13 est ensuite utilisé comme matrice dans la réaction de transcription in vitro à l'aide de la SP6-polymerase (SP6 MEGAscript, Ambion).

10

e/ Synthèse de la région IIab

L'ADNc correspondant à la région IIab a été obtenu par amplification par PCR du plasmide pSP-IRES-luc+ à l'aide des amorces SP6 (SEQ ID 14) et SEQ ID 15 15 GTCCTGGTGGCTGCAGGACACTCATA. Le produit d'amplification SP6 -> SEQ ID est ensuite utilisé comme matrice dans la réaction de transcription in vitro à l'aide de la SP6-polymerase.

3/ Fixation du MRR de p110 sur l'IRES et ses domaines IIIabc, IIIeffV, IIab

20 Des fragments d'ARN radiomarqués sont obtenus par transcription in vitro des matrices précitées en présence de [α -32P]UTP. Les fragments d'ARN sont purifiés dans un gel à 6 % d'acrylamide-urée et précipités. Les culot d'ARN sont repris dans 25mM Tris-HCl, pH 7,4. Afin de permettre la rénaturaison, l'ARN a été incubé à 65°C dans le tampon précité pendant 5-7min puis lentement refroidi jusqu'à température ambiante. Les ARN rénaturés ont été incubés avec des concentrations croissantes de protéine dans le même 25 tampon 25mM Tris-HCl, pH 7,4, à température ambiante pendant 5 min.
 Le mélange de protéines et d'ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement lavée avec le même tampon. La radioactivité du filtre contenant les complexes ARN-protéine a été mesurée à l'aide de compteur de radioactivité MicroBeta
 30 Trilux (PerkinElmer).

Dans l'hypothèse d'une inhibition compétitive, le MRR de p110 a été préalablement incubé avec de l'ARN non radiomarqué (concentration : protéine 0,7 μ M, ARN : 0,1 à 1 μ M) pendant 30 min à température ambiante suivi de l'ajout de l'ARN de l'IRES

radiomarqué. L'analyse de fixation de l'ARN sur la protéine a été effectuée exactement comme décrit ci-dessus.

4/ Résultats

5

L'affinité des motifs de reconnaissance d'ARN (MRR) de la sous-unité p110 de eIF3 pour l'IRES entier et ses fragments II, IIIabc et IIIeffIV a été étudié par rétention sur nitrocellulose. Comme il apparaît sur la Figure 3, la protéine fixe l'IRES avec un Kd apparent de $0,8\mu M$. Cependant, l'affinité de MRRp110 pour le fragment IIIabc (site putatif de fixation de eIF3) est significativement inférieure à celle pour l'IRES et comparable à celle pour IIIeffIV utilisé comme témoin négatif. Cela était inattendu, d'autant que les résultats publiés antérieurement supposaient que la partie apicale de la boucle formant la région IIIb était le site probable de fixation de eIF3 (Sizova D, 1998, Buratti, 1998 Kieft et al, 2001), FR-A-2 815 358. En réalité et comme montre cette figure, le motif de reconnaissance de eIF3 se trouve non pas sur la région IIIabc mais sur la région II.

Exemple 2 : Identification de la séquence consensus se liant au MRR p110

20

1/ Production de sous-fragments aléatoires de l'IRES de VHC et procédé de sélection de fragments spécifiques se fixant au MRRp110 de eIF3

25

La méthode dénommée SERF (Selection of Random Fragments) décrite par STELZ (2000) est utilisée pour synthétiser les séquences aléatoires de l'IRES. Son principe est représenté sur la figure 4.

a/ Production des sous-fragments

30

2 ug ADNc de l'IRES sont digérés par 5U d'une Dnase I (Rnase-free, Amersham), à température ambiante, pendant 15 minutes, permettant d'obtenir des fragments d'ADNc, dont la taille varie entre 30 et 100 nucléotides. Des bouts francs sont générés à l'extrémité des fragments d'ADNc obtenus, par Taq-polymérase à $72^\circ C$, pendant 10 minutes dans un tampon PCR à base de dNTP 1 mMol. La Taq-polymerase ajoute en même temps des résidus supplémentaires « dA » à l'extremité 3' de fragments (Figure 4). Ceci permet d'augmenter l'efficacité de ligation des fragments obtenus dans le vecteur pGEM-T-Easy (Promega), muni à son tour de «dT» complémentaires à l'extremités 5' (Figure 4).

Les fragments d'ADN sont ensuite clonés en présence de T4 DNA ligase (BioLabs) dans un vecteur pGEM-T Easy (Promega) entre les promoteurs T7 et SP6. Les fragments d'ADN sont ensuite amplifiés en présence des oligonucléotides T7 et SP6 puis le produit d'amplification est utilisé comme matrice pour la transcription par SP6 (MEGAscript, Ambion). Les transcrits de taille supérieurs à 200nt correspondant aux transcrits avec l'insert > 60nt ont été purifiés sur gel d'acrylamide 10% 8M urée (figure 4, M correspondant à des marqueurs ARN "Century markers", Ambion).

b/ Sélection des sous-fragments

La protéine recombinante MRRp110 de eIF3 est purifiée sur colonne Ni-NTA-agarose dans des conditions natives (figure 5). La protéine purifiée est ensuite incubée avec la bibliothèque constituée des fragments d'ARN purifiés obtenus ci-dessus dans un tampon 25mM Tris-HCl, pH 7,4 pendant 15 min à température ambiante. La concentration de l'ARN est, au départ égale à 0,2 µM et celle de la protéine, égale à 0,8 µM. Le mélange protéine / ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement lavée avec le même tampon. Le filtre contenant les complexes ARN-protéine est ensuite coupé en morceaux et l'ARN est extrait avec une solution SDS, 0,1%, sodium acetate 0,3M pH 5,0 pendant une heure à température ambiante. L'ARN est ensuite récupéré par précipitation dans l'éthanol en présence d'ARNt utilisé pour faciliter la précipitation. Le culot d'ARN est ensuite repris dans 10µl d'eau et soumis à une transcription inverse en présence de la reverse transcriptase «Stratascript» de l'oligonucléotide T7 (Stratagene). Les fragments d'ADN simple brin sont ensuite amplifiés par PCR au moyen de l'oligonucléotide T7 (SEQ ID 14), de l'oligonucléotide SP6 (SEQ ID 14) et de la séquence SEQ ID 16 correspondant à la région linker adjacente à SP6.

- SEQ ID 16: TATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGCAT
CCAACGCGTTG

Une PCR de contrôle est conduite parallèlement avec les oligonucléotides SP6 et T7 afin de confirmer l'absence d'ADN-matrice contaminant, parmi les ARN sélectionnés. Les fragments amplifiés par PCR sont ensuite purifiés puis utilisés comme matrice de transcription dans le cycle suivant. Le cycle de sélection / amplification est répété 5 fois. Les produits de RT-PCR sont analysés sur gel d'agarose 2% (figure 5 : Φx sont des markers ADN (stratagène), 1 et 2 sont des produits d'amplification obtenus avec les amorces SP6 ou SEQ ID16. La concentration d'ARN lors des cycles ultérieurs est égale à 0,058 µM et celle de la protéine est diminuée régulièrement d'une valeur de 1,2 µM lors du second cycle à une valeur de 0,2 µM au cinquième cycle. Les produits de RT-PCR

obtenus après les quatrième et cinquième cycles sont clonés dans un plasmide pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) choisi pour faciliter le procédé de clonage en l'absence du promoteur T7. Les plasmides ont été purifiés et séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide de logiciel Clustal W DNA (Thompson , J.D.et al CLUSTAL W: 5 improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. (1994) Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680) disponible sur le site du Pôle Bio-Informatique Lyonnais.

10 2/ Résultats

Comme illustré figure 6A, parmi 16 séquences d'ARN sélectionnés, clonés au bout de 4 et 5 cycles et séquencés à l'aide T7 amorce, 13 clones contiennent la séquence ACGCCATGCTAGACGCTTCTGCGTAAGACAGTA correspondant à l'anti-sens de nt 56-92 de la séquence SEQ ID1, 2 clones contiennent CGCCTCATGCCTGGAGAT (nt 15 61-72 de SEQ ID1) et un clone montre une homologie avec la partie 84-90 de SEQ ID1. Ainsi, ces résultats identifient la région de l'IRES 56-92 SEQ ID3, TACTGTCTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTT comme correspondant au site de fixation de MRR p110 (figure 6B).

20 L'hypothèse de l'inhibition compétitive offre un moyen supplémentaire d'étude de la spécificité de l'interaction en question. Comme il est indiqué sur la figure 7, les séquences consensus des clones 4-35 (DOR 4-35) et 5-4 (DOR 5-4) sont les inhibiteurs les plus efficaces (après l'IRES lui-même) de l'interaction IRES-MRR de p110. Ces résultats confirment que la séquence consensus identifiée est un déterminant de la fixation de MRR 25 p110 sur l'IRES entier.

Exemple 3 : Test de criblage in-vitro

L'intérêt de la présente découverte est de chercher à inhiber la fixation du MRR de p110 30 sur la séquence consensus SEQ ID 3 de la région II de l'IRES pour empêcher l'initiation de la traduction et par conséquent la synthèse protéique par le VHC.

Parmi les molécules potentielles, le Demandeur a sélectionné les aminoglycosides.

Le test de criblage est effectué comme suit. On incube le MRR de p110 et la séquence consensus de la région II en présence de différents aminoglycosides. Le mélange d'ARN est ensuite déposé sur une membrane de nitrocellulose dans les mêmes conditions que dans l'exemple 2.

5

Les résultats sont représentés sur la figure 8. Parmi les 15 aminoglycosides testés à 4 concentrations différentes, la tobramycine est le seul aminoglycoside capable d'inhiber la formation des complexes ARN-protéines à toutes les concentrations testées.

10 Exemple 4 : Inhibition de la traduction cap-indépendante ex vivo

Dans cet exemple, on confirme les résultats de l'exemple 2 en démontrant que l'inhibition de la formation du complexe protéines / ARN empêche la traduction cap-indépendante dans des cellules ex vivo.

15

a/ Préparation de vecteurs bicistroniques

Des construits bicistroniques constitués d'un premier cistron correspondant au gène de la luciférase Renilla, suivi de la séquence IRES, suivi d'un second cistron correspondant au gène de la luciférase Firefly (pRLuc-IRES-Fluc) sont préparés de la façon suivante. Un plasmide pRL-SV40 (Promega) est linéarisé avec Xba I et déphosphorylé. Parallèlement, l'IRES est amplifié avec le gène de la luciférase Firefly par PCR, en présence d'oligonucléotides complémentaires contenant les sites XbaI. Les produits de PCR sont ensuite sous-clonés dans le plasmide pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) afin de contrôler la digestion. La ligation de l'insert contenant l'IRES avec le gène de la luciférase Firefly et le vecteur pRL-SV40 linéarisé est effectuée à l'aide de T4 DNA ligase (Biolabs).

25

b/ Transfection de cellule HeLa

10⁷ cellules HeLa suspendues dans du DMEM exempté de sérum sont transfectées par 1 à 2,5 ug de plasmide pRLuc-IRES-Fluc par électroporation à 0,5 V pendant 30 millisecondes au moyen d'un Gene Pulser (BioRad). Les cellules sont ensuite cultivées dans des plaques 24 ou 96 trous en présence de différentes aminoglycosides, à des concentrations comprises entre 2 et 5 mM pendant 24-36hs. L'activité de luciférase Renilla (traduction cap-dépendante) et celle de la luciférase Firefly (traduction cap-indépendante=virale) dans les lysats cellulaires est mesurée et comparée au moyen du test Dual-luciférase (Promega) et de luminomètre Lumat LB9507 (Berthold).

35

c/ Résultats

D'après les résultats apparaissant figure 9, la tobramycine bloque la traduction "IRES dépendante" sans affecter la traduction cap-dépendante. Les aminoglycosides bloquent 5 l'interaction IRES / eIF3 dans la cellule et donc la synthèse de protéine virale. Cela signifie que les aminoglycosides, et plus particulièrement la tobramycine, peuvent être utilisés pour traiter l'hépatite C.

BIBLIOGRAPHIE

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. (1989) Science 244:359-62 "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome."
5. Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1998) J Virol 72:4775-82, Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs.
10. 3. Kieft J., Zhou K., Jubin R., Doudna J., RNA (2001), 7:194-206, Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA
4. Buratti E, Tisminetzky S, Zotti M, Baralle FE (1998) Nucleic Acids Res 26:3179-87 Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3.
15. 5. Zhao WD, Wimmer E. (2001) J Virol 75:3719-30 Genetic analysis of a poliovirus/hepatitis C virus chimera: new structure for domain II of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus.
6. Block KL, Vornlocher HP, Hershey JW. Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3. (1998) J Biol Chem. 273:31901-8.
20. 7. Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW. (1997) Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly. J Biol Chem. 272:27042-52.
25. 8. Stelz U, Spahn C, Nierhaus KH, (2000) Proc Natl Acad Scie USA 97, 4597-4602 «Selecting rRNA binding sites for the ribosomal proteins L4 et L6 from randomly fragmented rRNA application of method called SERF»

REVENDICATIONS

1/ Procédé de criblage de molécules selon lequel, in vitro :

5 a/ on incube ensemble la sous unité p110 (SEQ ID4) de la protéine eIF3, la
 séquence nucléotidique de la région II (SEQ ID2) de l'IRES de VHC ou toute
 séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ
 ID 2) de l'IRES de VHC et la molécule à tester,
10 b/ on détecte ensuite la formation éventuelle de complexe p110 / région II IRES,
 l'absence de complexe témoignant de la capacité inhibitrice de la molécule
 testée, à inhiber la formation desdits complexes,
 c/ on sélectionne les molécules inhibant la formation des complexes.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que seule la séquence du motif de
15 reconnaissance de la protéine p110 (SEQ ID5) est incubée.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que seule une partie de la région II
est incubée et correspond à la séquence nucléotidique consensus SEQ ID3 ou une
séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.
20

4/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la molécule à tester est incubée
à des doses croissantes.

5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la détection est effectuée par
25 filtration du mélange au travers d'une membrane de nitrocellulose, puis par mesure de la
 radioactivité liée à la membrane correspondant à la quantité d'ARN fixée sur la
 membrane.

6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on teste ensuite, ex vivo,
30 l'influence de la molécule sélectionnée en c) sur la traduction cap-indépendante et la
 traduction cap-dépendante pour ne retenir que les molécules inhibant la traduction
 cap-indépendante sans influencer la traduction cap-dépendante.

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on construit des vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement.

5

8/ Utilisation des molécules sélectionnées à l'issue du procédé de criblage objet de l'une des revendications 1 à 7 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

10

9/ Utilisation d'un aminoglycoside pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

15

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'aminoglycoside est la tobramycine.

20

11/ Composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.

12/ Utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3 comme médicament, pour le traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

25

13/ Procédé de criblage d'une bibliothèque de molécules *in silico* consistant :

30

- à déterminer les coordonnées atomiques soit de la région II de l'IRES (SEQ ID 2) du VHC ou de toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2) de l'IRES de VHC, soit de la séquence se liant spécifiquement au MRR de la protéine P110 de eIF3 (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3, soit du complexe de la région II (SEQ ID 2) ou de la séquence spécifique

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on construit des vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement.

5

8/ Utilisation des molécules sélectionnées à l'issue de l'étape c/ du procédé de criblage objet de la revendication 1 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

10

9/ Utilisation d'un aminoglycoside pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

15

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'aminoglycoside est la tobramycine.

20

11/ Composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.

12/ Utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3 comme médicament, pour le traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

25

30 Déposant : UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
 Mandataire : Cabinet LAURENT ET CHARRAS

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on construit des vecteurs bicistroniques constitués de deux luciférase encadrant la séquence de la région II (SEQ ID 2) ou toute séquence contenant au moins 10 nucléotides successifs de la région II (SEQ ID 2), ou la séquence consensus (SEQ ID 3) ou une séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3; la première luciférase étant traduite de manière cap-dépendante et la seconde de manière cap-indépendante ou inversement.

5

8/ Utilisation des molécules sélectionnées à l'issue de l'étape c/ du procédé de criblage objet de la revendication 1 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

10

9/ Utilisation d'un aminoglycoside pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

15

10/ Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'aminoglycoside est la tobramycine.

20

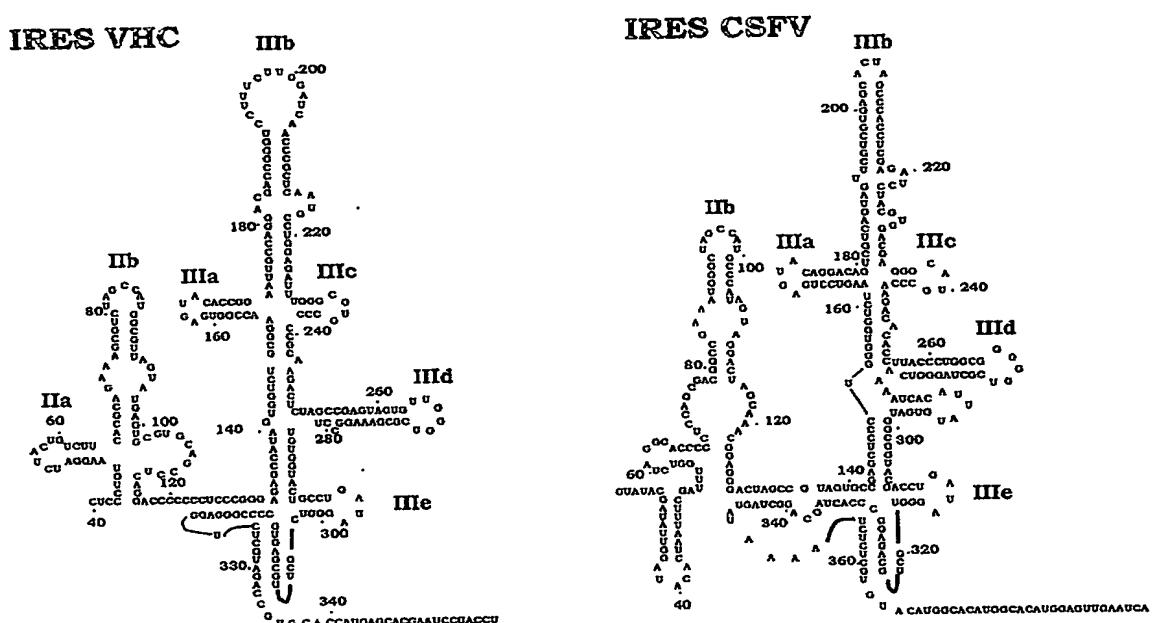
11/ Composition pharmaceutique comprenant un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3.

12/ Utilisation d'un oligonucléotide anti-sens complémentaire de la séquence SEQ ID 3 ou toute séquence comprenant au moins 8 nucléotides successifs de la séquence SEQ ID 3 comme médicament, pour le traitement de l'hépatite C (VHC), de la peste porcine (CSFV), de la diarrhée bovine (BVDV).

25

(SEQ ID 3) avec le motif de reconnaissance de la protéine p110 de eIF3 (SEQ ID 5)

- puis à cibler la bibliothèque de molécules chimiques avec les coordonnées atomiques ainsi déterminées.

**FIGURE 1A**

2 / 12

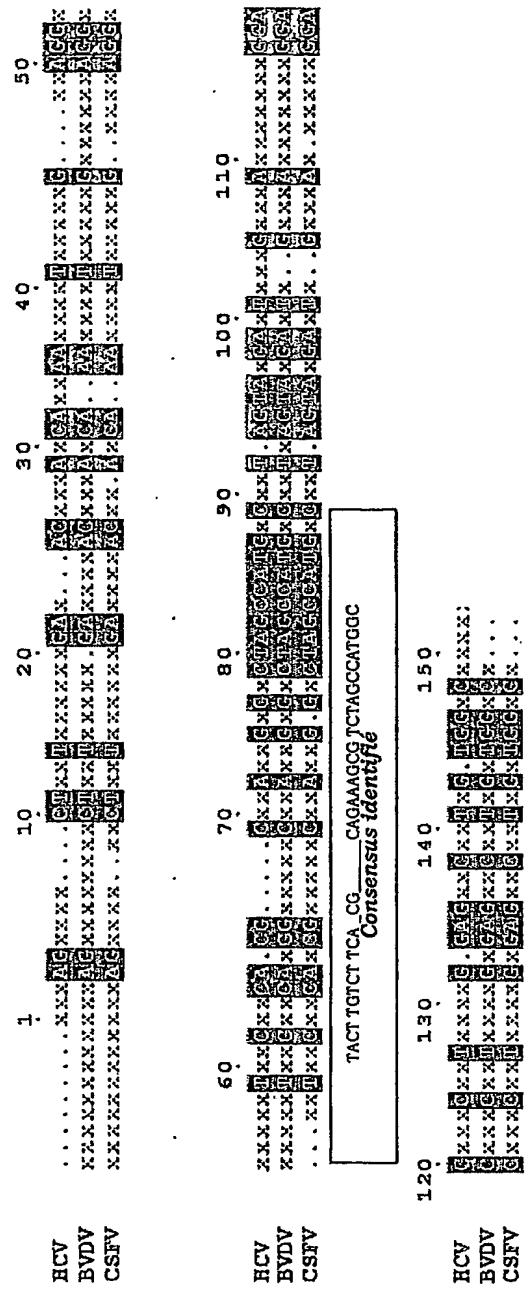


FIGURE 1B

3 / 12

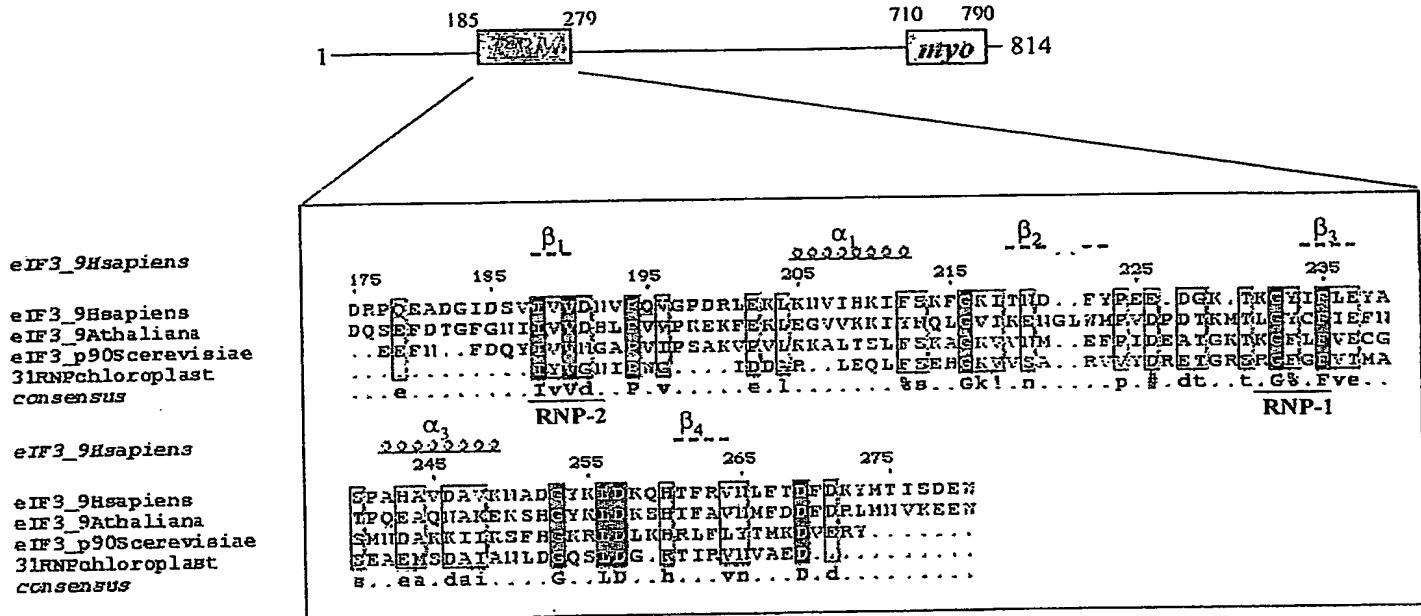


FIGURE 2

4 / 12

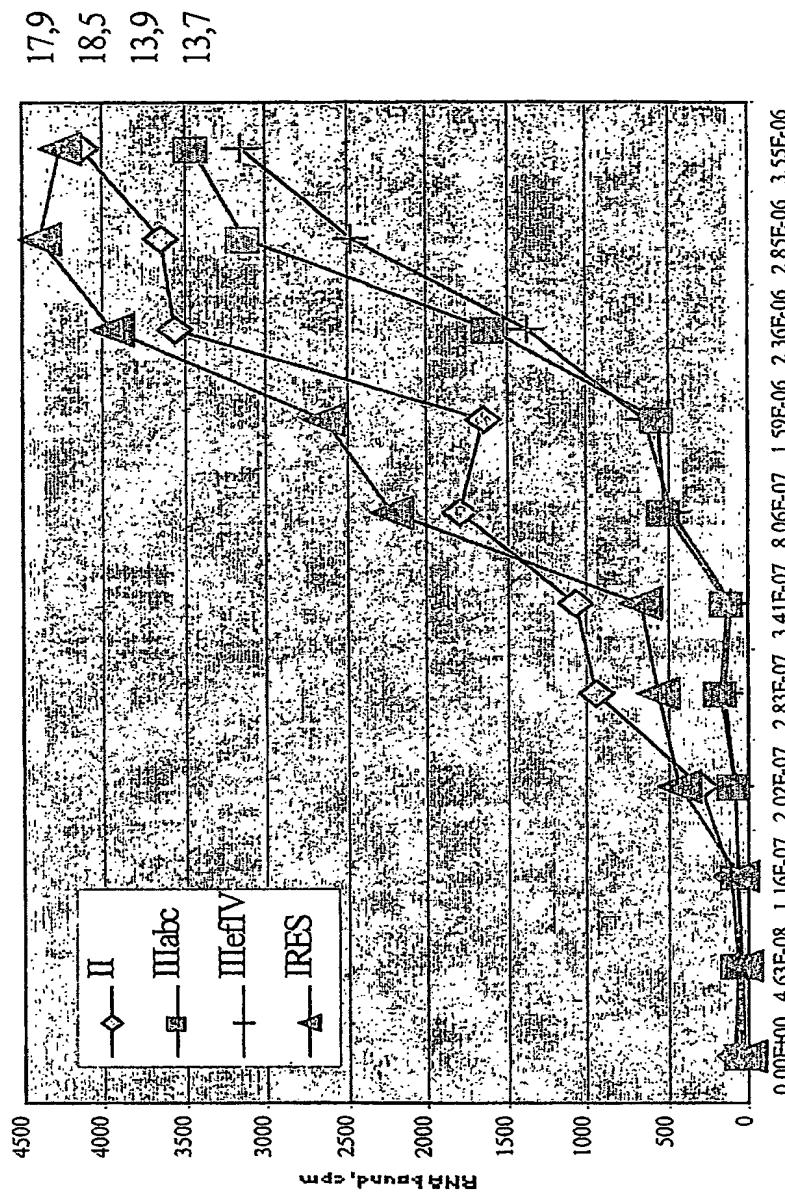


FIGURE 3

[RRMphi110eJF3],

5 / 12

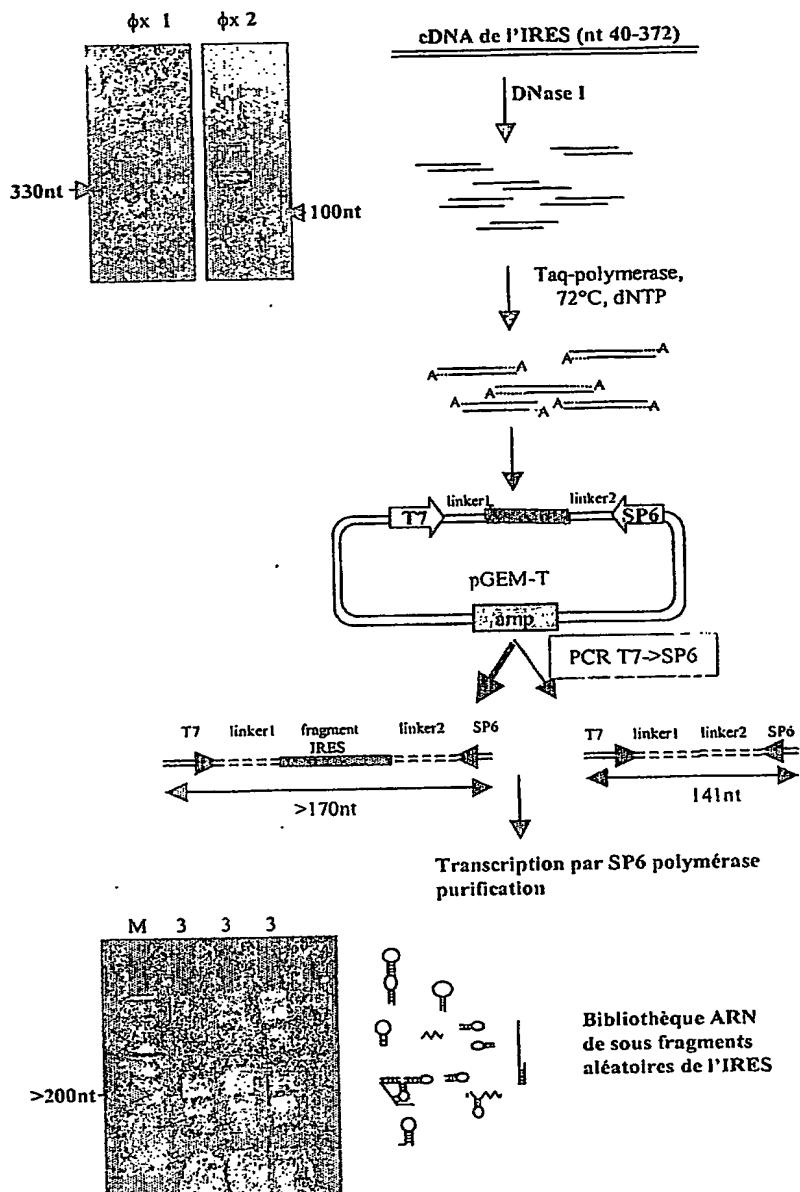


FIGURE 4

6/12

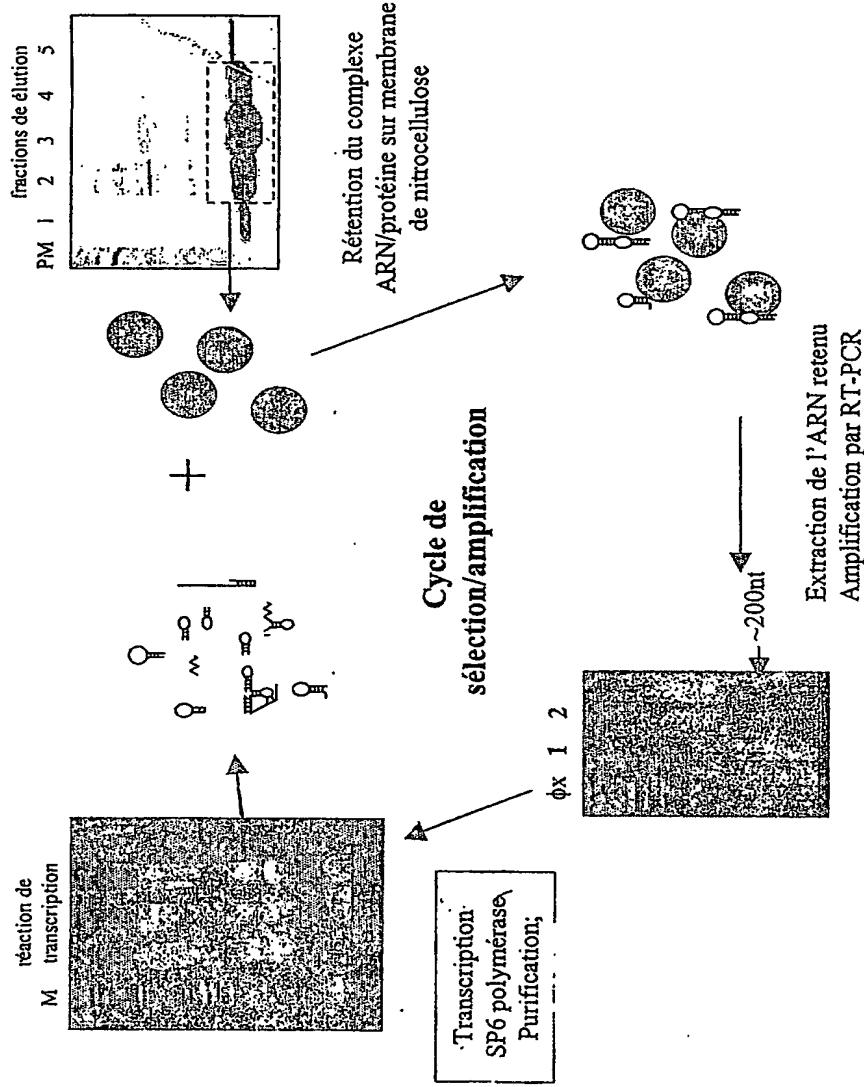
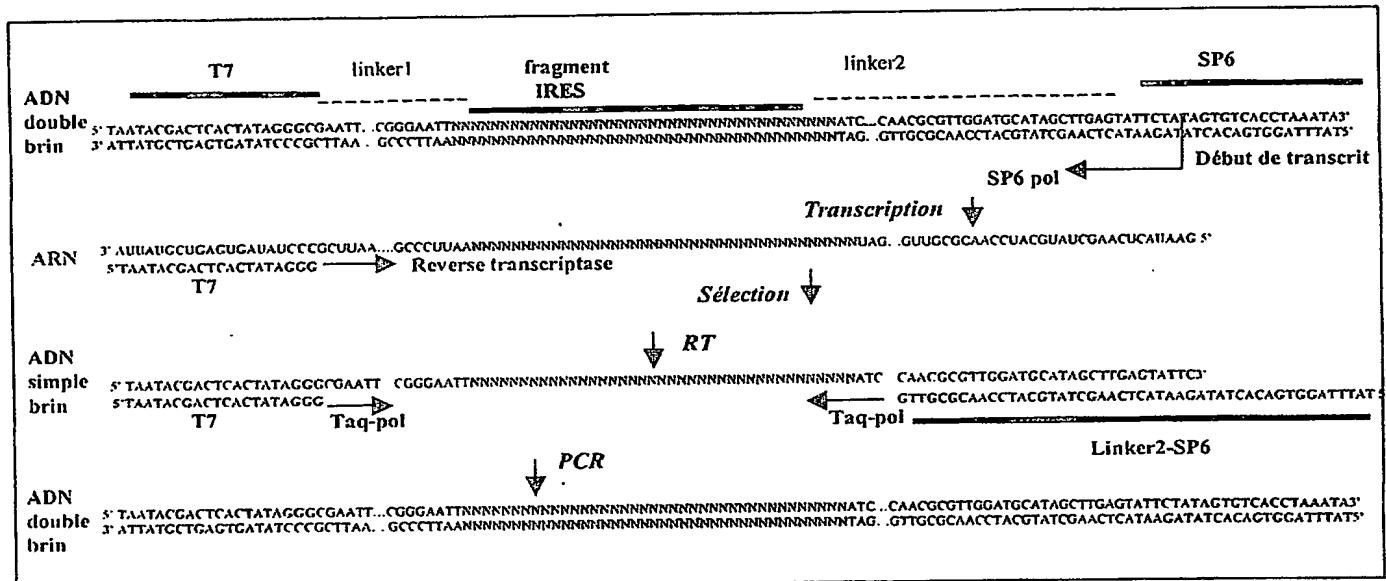


FIGURE 5A

7/12

FIGURE 5B



8 / 12

The figure displays a sequence alignment of pGEMTIREs and various DOR genes (DOR4_21, DOR4_28, DOR4_33, DOR4_4, DOR4_35, DOR4_45, DOR4_46, DOR5_2, DOR5_4, DOR5_6, DOR5_7, DOR5_8, DOR5_10, DOR5_12, DOR5_14, DOR5_16) across five columns labeled 1, 10, 20, 30, and 40. The sequences are shown as black boxes with white text. A horizontal arrow labeled "linker2" points from left to right above the first two columns. Below the alignment, a box highlights a 5' AACGCCATGCTAGACGCTTTCTCGGTGAAGACAGTA 3' sequence with the label "Consensus (antisens)".

FIGURE 6A

9/12

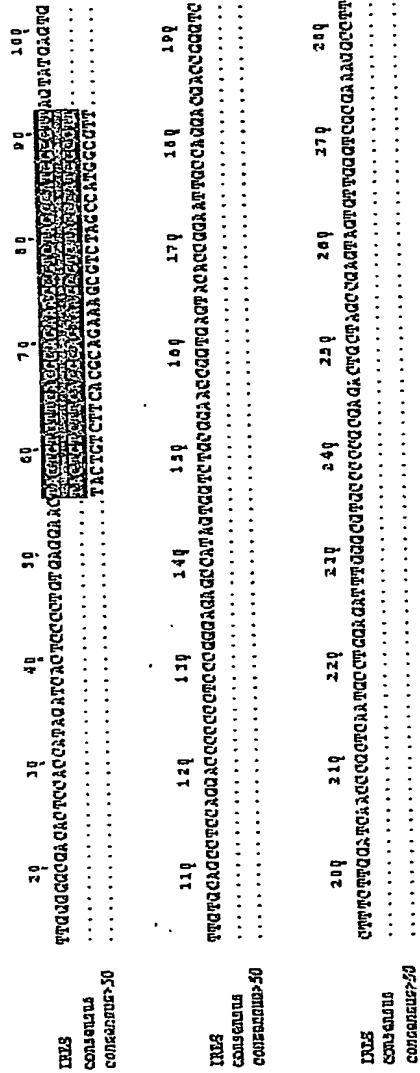
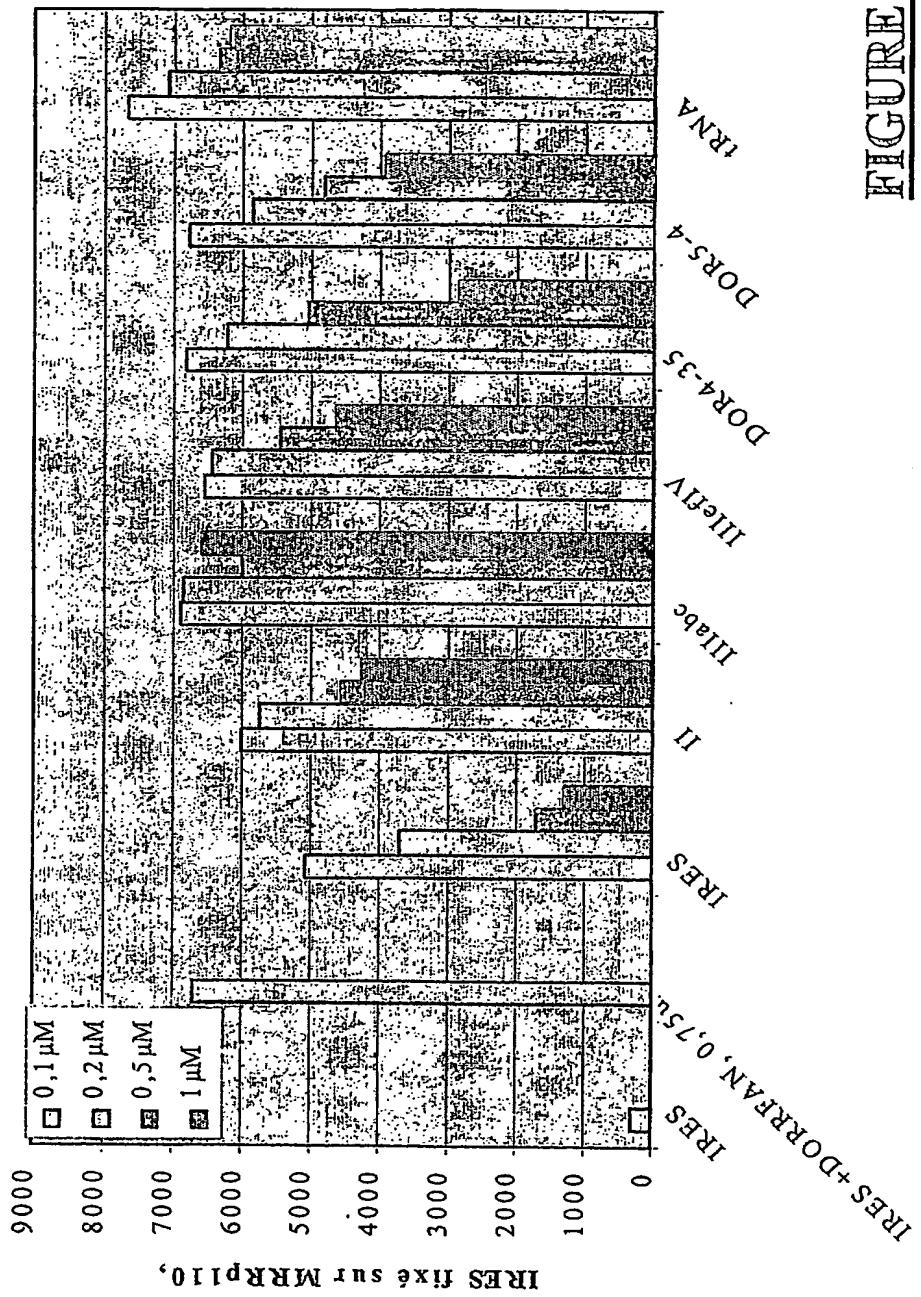


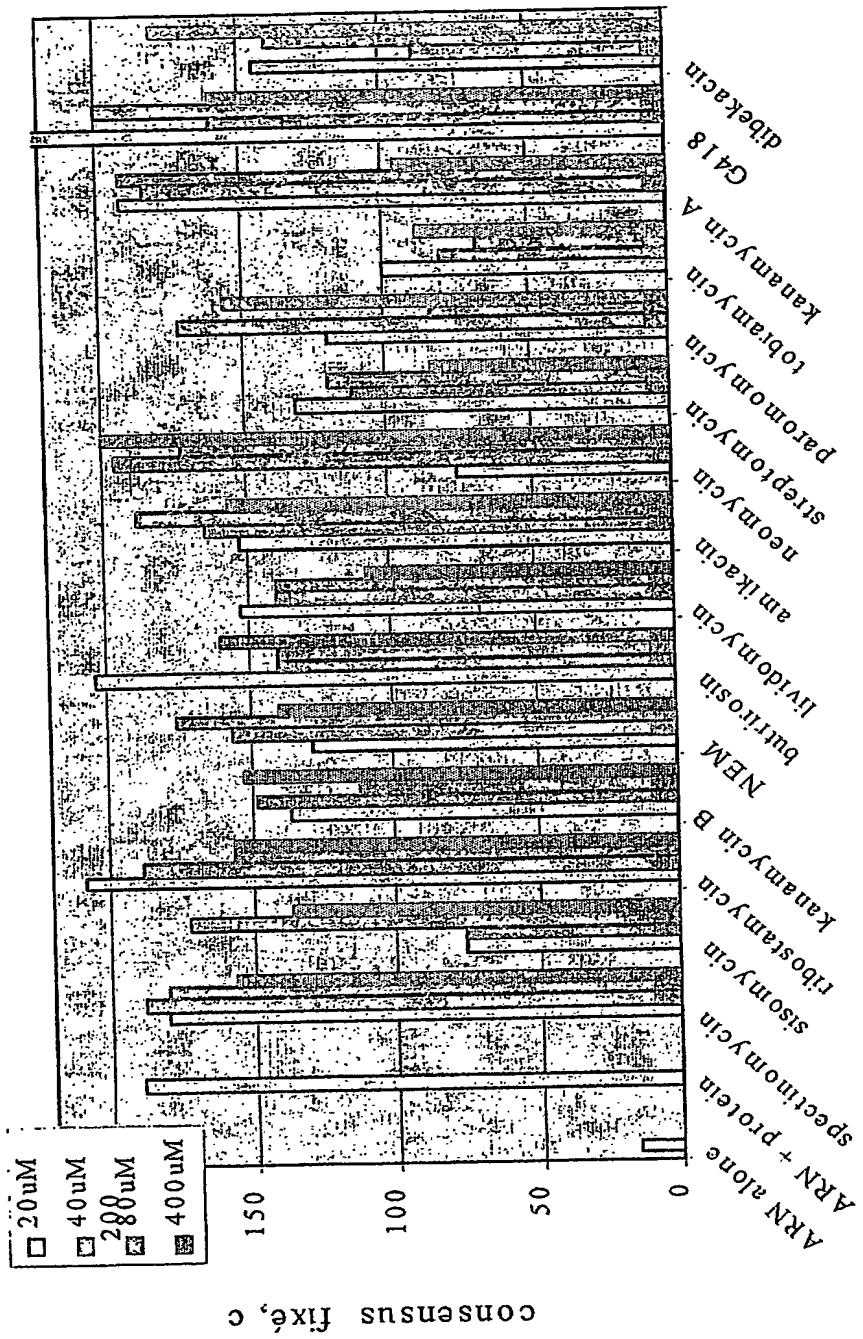
FIGURE 6B

10/12



11/12

FIGURE 8



11/12

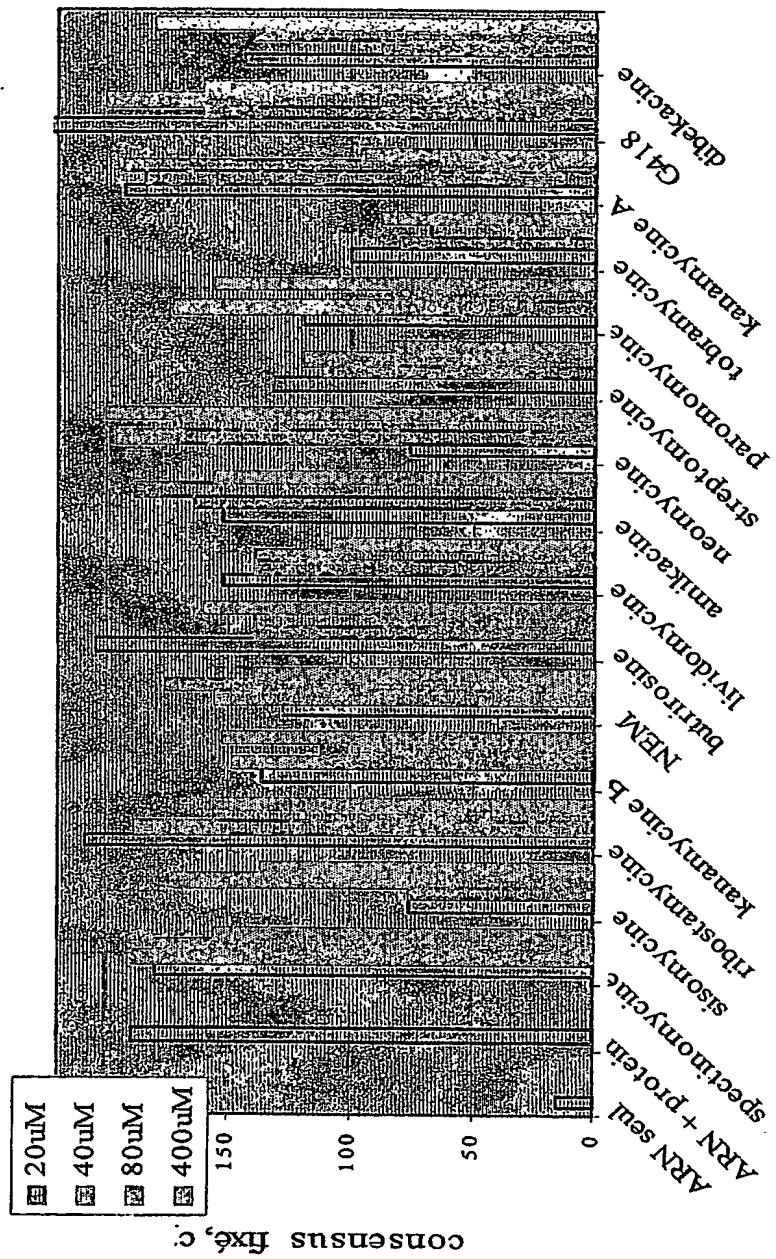


FIGURE 8

12/12

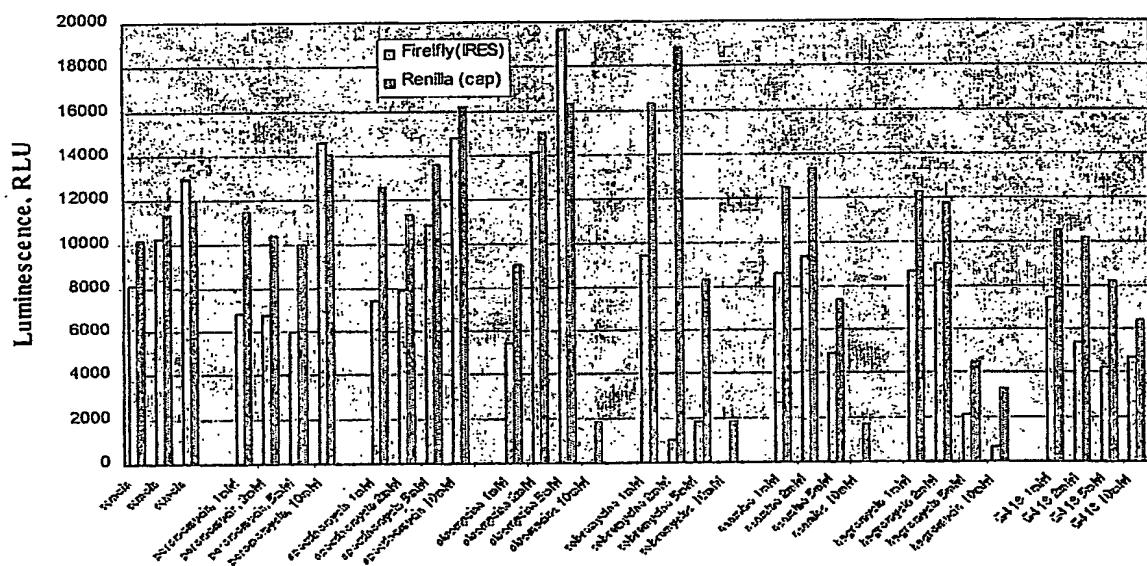
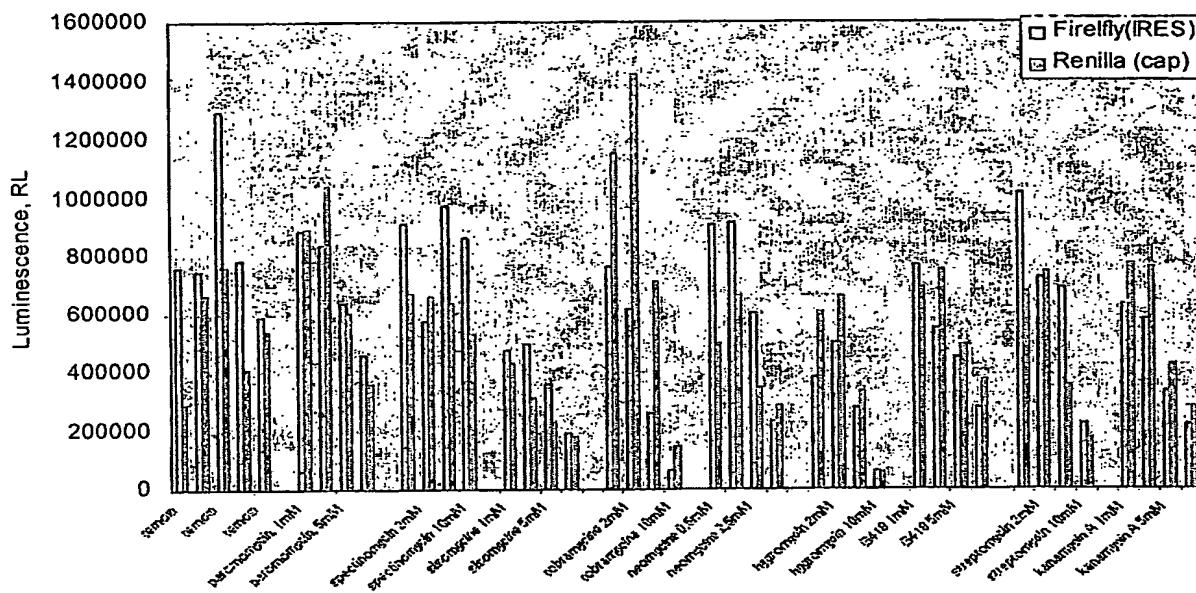


FIGURE 9

12/12

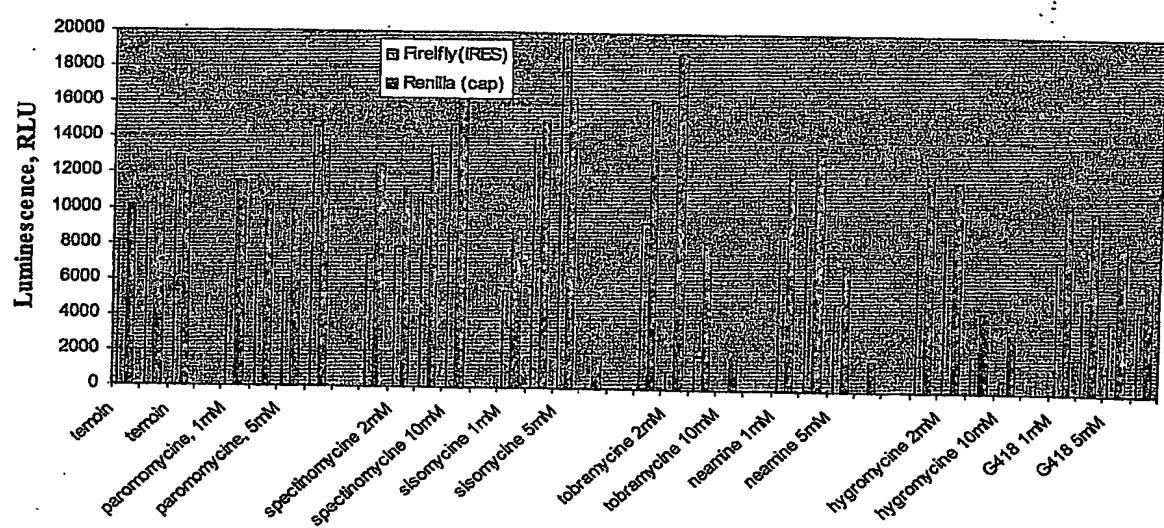
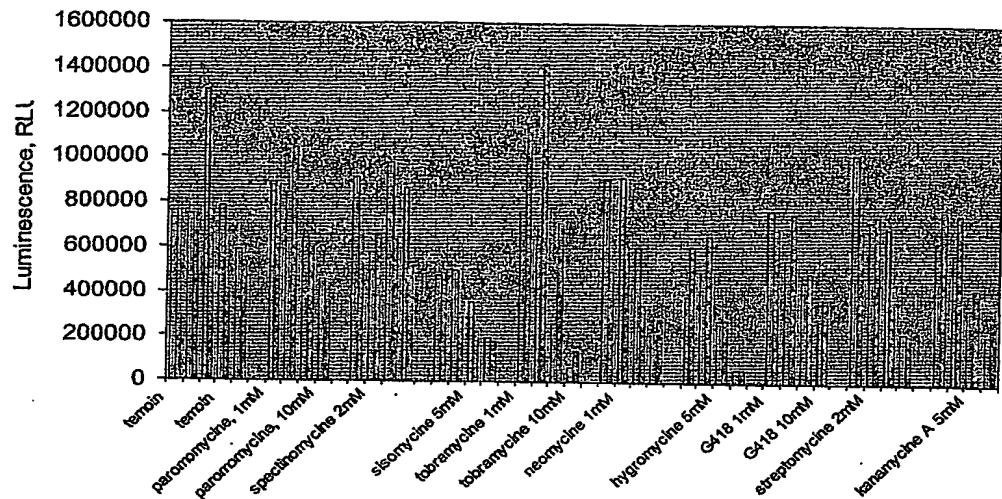


FIGURE 9

SEQUENCE LISTING

<110> UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

<120> MOLECULE INHIBITRICES DE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE DU VIRUS
DE L'HEPATITE C ET PROCEDE DE CRIBLAGE DESDITES MOLECULES INHIB
ITRICES

<130> U19-B-19536

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 326

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IRES du VHC

<400> 1

ctccccctgtg aagaactact gtcttcacgc agaaagcgtc tagccatggc gtttagtat
ga 60

gtgtcgtgca gcctccagga ccccccctcc cgggagagcc atagtggtct gcggaaacc
gg 120

tgagtacacc ggaattgcca ggatgaccgg gtcctttctt ggatcaaccc gctcaatg
cc 180

tggagatttg ggcgtgcccc cgcgagactg ctagccgagt agtgtgggt cgcgaaag
gc 240

cttgggttac tgcctgatag ggtgcttgcg agtgccccgg gaggtctcgt agaccgtg
ca 300

tcatgagcac aaatcctaaa gaaaaa

326

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Séquence

<220>

<223> Région II de lRES de VHC

<400> 2

ctccccctgtg aggaactact gtcttcacgc agaaagcgtc tagccatggc gtttagtat

ga. 60

gtgttgtgca gcctccagga
80

<210> 3
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Séquence consensus

<400> 3
tactgtcttc acgcagaaag cgtcttagcca tggcgtt
37

<210> 4
<211> 814
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sous unité p110 de eIF3

<400> 4

Met Gln Asp Ala Glu Asn Val Ala Val Pro Glu Ala Ala Glu Glu Arg
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Gln Gln Pro Ala Ala Glu Pro Pro Pro Ala Glu
20 25 30

Gly Leu Leu Arg Pro Ala Gly Pro Gly Ala Pro Glu Ala Ala Gly Thr
35 40 45

Glu Ala Ser Ser Glu Glu Val Gly Ile Ala Glu Ala Gly Pro Glu Pro
50 55 60

Glu Val Arg Thr Glu Pro Ala Ala Glu Ala Ala Ser Gly Pro
65 70 75 80

Ser Glu Ser Pro Ser Pro Pro Ala Ala Glu Glu Leu Pro Gly Ser His
85 90 95

Ala Glu Pro Pro Val Pro Ala Gln Gly Glu Ala Pro Gly Glu Gln Ala
100 105 110

Arg Asp Glu Arg Ser Asp Ser Arg Ala Gln Ala Val Ser Glu Asp Ala
115 120 125

Gly Gly Asn Glu Gly Arg Ala Ala Glu Ala Glu Pro Arg Ala Leu Glu
130 135 140

Asn Gly Asp Ala Asp Glu Pro Ser Phe Ser Asp Pro Glu Asp Phe Val
145 150 155 160

Asp Asp Val Ser Glu Glu Leu Leu Gly Asp Val Leu Lys Asp Arg
165 170 175

Pro Gln Glu Ala Asp Gly Ile Asp Ser Val Ile Val Val Asp Asn Val
180 185 190

Pro Gln Val Gly Pro Asp Arg Leu Glu Lys Leu Lys Asn Val Ile His
195 200 205

Lys Ile Phe Ser Lys Phe Gly Lys Ile Thr Asn Asp Phe Tyr Pro Glu
210 215 220

Glu Asp Gly Lys Thr Lys Gly Tyr Ile Phe Leu Glu Tyr Ala Ser Pro
225 230 235 240

Ala His Ala Val Asp Ala Val Lys Asn Ala Asp Gly Tyr Lys Leu Asp
245 250 255

Lys Gln His Thr Phe Arg Val Asn Leu Phe Thr Asp Phe Asp Lys Tyr
260 265 270

Met Thr Ile Ser Asp Glu Trp Asp Ile Pro Glu Lys Gln Pro Phe Lys
275 280 285

Asp Leu Gly Asn Leu Arg Tyr Trp Leu Glu Glu Ala Glu Cys Arg Asp
290 295 300

Gln Tyr Ser Val Ile Phe Glu Ser Gly Asp Arg Thr Ser Ile Phe Trp
305 310 315 320

Asn Asp Val Lys Asp Pro Val Ser Ile Glu Glu Arg Ala Arg Trp Thr
325 330 335

Glu Thr Tyr Val Arg Trp Ser Pro Lys Gly Thr Tyr Leu Ala Thr Phe

340

345

350

His Gln Arg Gly Ile Ala Leu Trp Gly Gly Glu Lys Phe Lys Gln Ile

355

360

365

Gln Arg Phe Ser His Gln Gly Val Gln Leu Ile Asp Phe Ser Pro Cys

370

375

380

Glu Arg Tyr Leu Val Thr Phe Ser Pro Leu Met Asp Thr Gln Asp Asp

385

390

395

400

Pro Gln Ala Ile Ile Ile Trp Asp Ile Leu Thr Gly His Lys Lys Arg

405

410

415

Gly Phe His Cys Glu Ser Ser Ala His Trp Pro Ile Phe Lys Trp Ser

420

425

430

His Asp Gly Lys Phe Phe Ala Arg Met Thr Leu Asp Thr Leu Ser Ile

435

440

445

Tyr Glu Thr Pro Ser Met Gly Leu Leu Asp Lys Lys Ser Leu Lys Ile

450

455

460

Ser Gly Ile Lys Asp Phe Ser Trp Ser Pro Gly Gly Asn Ile Ile Ala

465

470

475

480

Phe Trp Val Pro Glu Asp Lys Asp Ile Pro Ala Arg Val Thr Leu Met
485 490 495

Gln Leu Pro Thr Arg Gln Glu Ile Arg Val Arg Asn Leu Phe Asn Val
500 505 510

Val Asp Cys Lys Leu His Trp Gln Lys Asn Gly Asp Tyr Leu Cys Val
515 520 525

Lys Val Asp Arg Thr Pro Lys Gly Thr Gln Gly Val Val Thr Asn Phe
530 535 540

Glu Ile Phe Arg Met Arg Glu Lys Gln Val Pro Val Asp Val Val Glu
545 550 555 560

Met Lys Glu Thr Ile Ile Ala Phe Ala Trp Glu Pro Asn Gly Ser Lys
565 570 575

Phe Ala Val Leu His Gly Glu Ala Pro Arg Ile Ser Val Ser Phe Tyr
580 585 590

His Val Lys Asn Asn Gly Lys Ile Glu Leu Ile Lys Met Phe Asp Lys
595 600 605

Gln Gln Ala Asn Thr Ile Phe Trp Ser Pro Gln Gly Gln Phe Val Val
610 615 620

Leu Ala Gly Leu Arg Ser Met Asn Gly Ala Leu Ala Phe Val Asp Thr
625 630 635 640

Ser Asp Cys Thr Val Met Asn Ile Ala Glu His Tyr Met Ala Ser Asp
645 650 655

Val Glu Trp Asp Pro Thr Gly Arg Tyr Val Val Thr Ser Val Ser Trp
660 665 670

Trp Ser His Lys Val Asp Asn Ala Tyr Trp Leu Trp Thr Phe Gln Gly
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Lys Asn Asn Lys Asp Arg Phe Cys Gln Leu Leu Trp
690 695 700

Arg Pro Arg Pro Pro Thr Leu Leu Ser Gln Glu Gln Ile Lys Gln Ile
705 710 715 720

Lys Lys Asp Leu Lys Lys Tyr Ser Lys Ile Phe Glu Gln Lys Asp Arg
725 730 735

Leu Ser Gln Ser Lys Ala Ser Lys Glu Leu Val Glu Arg Arg Arg Thr
740 745 750

Met Met Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Arg Lys Met Ala Gln Glu Leu Tyr

755

760

765

Met Glu Gln Lys Asn Glu Arg Leu Glu Leu Arg Gly Gly Val Asp Thr

770

775

780

Asp Glu Leu Asp Ser Asn Val Asp Asp Trp Glu Glu Glu Thr Ile Glu

785

790

795

800

Phe Phe Val Thr Glu Glu Ile Ile Pro Leu Gly Asn Gln Glu
805 810

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MRR de p110

<400> 5

Met Asp Arg Pro Gln Glu Ala Asp Gly Ile Asp Ser Val Ile Val Val

1

5

10

15

Asp Asn Val Pro Gln Val Gly Pro Asp Arg Leu Glu Lys Leu Lys Asn

20

25

30

Val Ile His Lys Ile Phe Ser Lys Phe Gly Lys Ile Thr Asn Asp Phe

35

40

45

Tyr Pro Glu Glu Asp Gly Lys Thr Lys Gly Tyr Ile Phe Leu Glu Tyr

50

55

60

Ala Ser Pro Ala His Ala Val Asp Ala Val Lys Asn Ala Asp Gly Tyr

65 70 75 80

Lys Leu Asp Lys Gln His Thr Phe Arg Val Asn Leu Phe Thr Asp Phe

85 90 95

Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Asp Glu Trp
100 105

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MRRfwd

<400> 6

catatggatc ggcccccagga agcagatgga atc
33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MRRrev

<400> 7

gtgctcgagc cactcgtcac tgatcgtcat ata
33

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IRESfwd

<400> 8
accgctagcc tcccctgtga ggaactact
29

<210> 9
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IRESrev

<400> 9
gaaagctttt ttctttgagg tttaggattt gtgctcatga tgcacg
46

<210> 10
<211> 95
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IIIabcfwd

<400> 10
taatacgaact cactataggg tagtgtctg cggaaccggt gagtacacccg gaattgcc,
ag 60

gacgaccggg tcctttcttg gataaacccg ctcaa
95

<210> 11
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IIIabcrev

<400> 11
tagcagtctc gcggggcac gcccaaatct ccaggcattg agcgggttga tccaagaa
ag 60

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> T7

<400> 12
taatacgact cactataggg
20

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IIIabcrev

<400> 13
tagcagtctc gcggggcac g
21

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SP6

<400> 14
tat taggtg acactataga at
22

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linkerrev

<400> 15
gtcctgggtgg ctgcaggaca ctcatac
27

<210> 16
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LinkerSP6

<400> 16

tat tagtg acactataga atactcaagc tatgcattcca acgcgttg

48



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

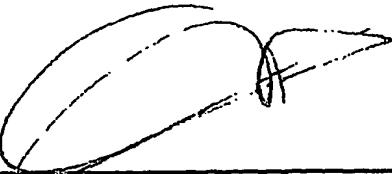


DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 EW / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	U19-B-19536 FR											
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0215718											
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)												
MOLECULES INHIBITRICES DE LA SYNTHESE PROTEIQUE DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET PROCEDE DE CRIBLAGE DESDITES MOLECULES INHIBITRICES												
LE(S) DEMANDEUR(S) :												
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER 621 Avenue Centrale 38041 GRENOBLE Cedex 9												
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :												
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>BALAKIREVA</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Larissa</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>7 Rue des Beaux Tailleurs</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[3] [8] [0] [0] [0] GRENOBLE</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BALAKIREVA	Prénoms		Larissa	Adresse	Rue	7 Rue des Beaux Tailleurs	Code postal et ville	[3] [8] [0] [0] [0] GRENOBLE
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BALAKIREVA										
Prénoms		Larissa										
Adresse	Rue	7 Rue des Beaux Tailleurs										
	Code postal et ville	[3] [8] [0] [0] [0] GRENOBLE										
Société d'appartenance (facultatif)												
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[] [] [] [] []</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom		Prénoms			Adresse	Rue		Code postal et ville	[] [] [] [] []
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom											
Prénoms												
Adresse	Rue											
	Code postal et ville	[] [] [] [] []										
Société d'appartenance (facultatif)												
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[] [] [] [] []</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom		Prénoms			Adresse	Rue		Code postal et ville	[] [] [] [] []
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom											
Prénoms												
Adresse	Rue											
	Code postal et ville	[] [] [] [] []										
Société d'appartenance (facultatif)												
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.												
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)												
 Bruno VUILLERMOZ, Mandataire												

PCT Application
PCT/FR2003/003675



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.